

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **06298654 A**

(43) Date of publication of application: **25.10.94**

(51) Int. Cl

A61K 35/26
A61K 35/14
A61K 39/395
A61K 45/00
/(A61K 45/00 , A61K 39:395 , A61K 35:26
)

(21) Application number: **05108856**

(22) Date of filing: **12.04.93**

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor: **BASOKUDA HISASHI**
YAKIDA HIDEO
OKUMURA YASUSHI
NAKADA MOTOMI

(54) **ANTIGEN SPECIFIC IMMUNOSUPPRESSANT**

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain an antigen specific immunosuppressant capable of specifically suppressing rejection of organ piece in organ transplantation and permanently controlling rejection of organ piece after organ transplantation.

CONSTITUTION: An antigen specific immunosuppressant comprises a combination of (a) an

antibody against an intercellular adhesion factor, (b) peripheral lymphocyte of a donor and (C) an immunosuppressant.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-298654

(43)公開日 平成6年(1994)10月25日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/26		7431-4C		
35/14	Z	7431-4C		
39/395		9284-4C		
45/00	A B C	8415-4C		

// (A 6 1 K 45/00

審査請求 未請求 請求項の数 1 F D (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-108856

(22)出願日 平成5年(1993)4月12日

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 場集田 寿

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部 免疫学教室内

(72)発明者 八木田 秀雄

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部 免疫学教室内

(72)発明者 奥村 康

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部 免疫学教室内

(74)代理人 弁理士 西川 繁明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原特異的免疫抑制剤

(57)【要約】

【目的】 臓器移植における臓器片拒絶反応を特異的に抑制し、かつ、移植後の臓器片拒絶反応を永続的に抑制することができる抗原特異的免疫抑制剤を提供すること。

【構成】 (a) 細胞間接着因子に対する抗体、(b) 提供者(ドナー)の末梢血リンパ球、及び(c) 免疫抑制剤の組み合わせからなることを特徴とする抗原特異的免疫抑制剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 細胞間接着因子に対する抗体、
(b) 提供者（ドナー）の末梢血リンパ球、及び(c) 免疫抑制剤の組み合わせからなることを特徴とする抗原特異的免疫抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、腎臓、心臓等の移植における拒絶反応を特異的に抑制する抗原特異的免疫抑制剤に関し、さらに詳しくは、個体間での組織や臓器の移植による受容者（レシピエント）の拒絶反応を永続的に防止し、かつ、他の免疫反応については、阻害することなく、正常な免疫反応による個体の恒常性維持機構を確保する抗原特異的免疫抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】機能を喪失した臓器を、他の個体（ヒトまたはヒト以外の動物）の健康な臓器と交換することによって治療する、いわゆる移植には、拒絶反応が伴うことはよく知られている。生体には、体外から侵入してきた異物を非自己と認識して、これを体外に排除し、生体の恒常性を維持しようとする免疫反応が備わっている。他の個体からの移植臓器は、典型的な異物であり、生体の免疫機能による移植片拒絶反応を引き起こす。

【0003】移植片拒絶反応が免疫反応に基づいて起こるということは、それが生体防御機構に沿った生理的反応であることを意味する。しかし、治療としての移植を成立させるためには、生理的反応である拒絶反応を回避して、移植臓器を生着させる必要がある。この免疫学的拒絶反応を特異的にあるいは非特異的に抑制するために、各種の免疫抑制法の研究開発が進められている。

【0004】従来、免疫抑制は、一般に薬剤を使って行われており、この薬剤は、免疫抑制剤と呼ばれている。臓器移植の進歩にとって、移植を行うための外科的技術の進歩や臓器移植を支える人工臓器の発達なども不可欠の要素ではあるが、免疫抑制剤の進歩が極めて重要である。

【0005】これまでの免疫抑制法の歴史は、免疫抑制剤の開発の歴史でもあった。一番最初に使われた免疫抑制剤は、ステロイド剤である。1960年代から1980年にかけて、免疫抑制剤の中心は、アザチオプリンであった。それ以降は、シクロスポリンAの時代といわれている。この他に、現在では、ミゾリピン、デオキシスパーガリン、FK506、メソトレキセート、ラパマイシンなど多数の新しい免疫抑制剤が開発されている。

【0006】これらの薬剤は、免疫反応の流れのどの部分を阻止するかによって、免疫抑制剤としての持ち味が異なる。例えば、副腎皮質ステロイド薬は、循環性T細胞の数を減少させ、リンパ球の核酸代謝を阻害してその機能を抑制し、マクロファージの遊走や代謝を抑制して免疫反応を抑える。アザチオプリンやメソトレキセート

は、核酸の合成を抑えてリンパ球機能を抑制する。シクロスポリンAやFK506は、主にインターロイキン2の産生を抑えることによりT細胞の反応を抑制する。したがって、いくつかの免疫抑制剤を合併して使用したり、主として拒絶反応の予防剤として投与したり、あるいは発生した拒絶反応を治療するために投与したり、各薬剤の持ち味を生かした使われ方がなされている。

【0007】しかしながら、これらの免疫抑制剤は、長期投与する必要がある、その結果、様々な副作用がもたらされる。例えば、シクロスポリンAを投与すると、腎毒性などの副作用がもたらされ、問題となっている。また、同一の免疫抑制剤を繰り返し投与すると、徐々にその薬効が失われる。そのため、単に免疫抑制剤のみで拒絶反応を抑制することは、困難を来している。

【0008】抗リンパ球抗体（ALG）やT細胞（CD3）に対するモノクローナル抗体（抗CD3抗体）も、強い免疫抑制効果を示す。例えば、抗CD3抗体を注射すると、移植後の急性拒絶反応を抑制することができる。しかし、これらの抗体を用いた免疫抑制法は、一時的に拒絶反応を抑制できるに過ぎない。

【0009】しかも、免疫抑制剤や抗CD3抗体などは、いずれも、移植された人の免疫系全般を抑制することから、移植後は、細菌やウィルス等の感染に対しても抵抗力の減衰を来し、個体の恒常性維持機構に破綻を来すことになる。そこで、移植後は、無菌環境下とすることが必須であった。

【0010】腎移植において、予め臓器提供者（ドナー）の血を輸血しておく、移植腎の生着が良くなることが知られている。このように、宿主にドナー血の輸血を施して、ドナーに対する特異的免疫抑制を獲得させる試みが、ドナー・スペシフィック・トランスフュージョン（DST; donor specific transfusion）として、臨床で行われている。しかし、多数回の輸血により、ドナーの白血球に対する抗体が作られ、その抗体が拒絶反応を誘発して、移植の機会を失う場合がある。

【0011】免疫抑制法としては、特異的免疫抑制、即ち、移植臓器のアロ抗原に対する免疫応答のみを抑制することができ、しかも移植後の拒絶反応を永続的に抑制することができる方法が望まれているが、効果的な抗原特異的免疫抑制法あるいは免疫抑制剤は、未だ見出されていないのが現状であった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、臓器移植における臓器片拒絶反応を特異的に抑制し、かつ、移植後の臓器片拒絶反応を永続的に抑制することができる抗原特異的免疫抑制剤を提供することにある。

【0013】本発明者らは、前記従来技術の有する問題を克服するために鋭意研究した結果、レシピエントに対し、免疫抑制剤の投与に加え、細胞の接着分子（細胞

間接着因子)に対するモノクローナル抗体の投与、及びドナーの末梢血リンパ球のドナー・スペシフィック・トランスフュージョン(DST)を施すことにより、移植臓器に対して特異的な免疫抑制効果が得られ、しかも移植後の臓器片拒絶反応を永続的に抑制できることを見出し、その知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0014】

【課題を解決するための手段】かくして、本発明によれば、(a)細胞間接着因子に対する抗体、(b)提供者(ドナー)の末梢血リンパ球、及び(c)免疫抑制剤の組み合わせからなることを特徴とする抗原特異的免疫抑制剤が提供される。

【0015】T細胞の表面には、LFA-1(lymphocyte function associated antigen)やLFA-2(CD2)などの分子が存在するが、LFA-1は、他の細胞表面の対応物質ICAM-1(intercellular adhesion molecule)に結合し、LFA-2は、他の表面のLFA-3に結合して、T細胞と他の細胞との接触を助けている。これらのLFA-1、LFA-2、LFA-3、ICAM-1等の分子は、細胞間の接着を助けているため、接着分子または細胞間接着因子と総称されている。本発明では、これらの細胞間接着因子に対する抗体、例えば、抗ICAM-1抗体、抗LFA-1抗体等を使用する。

【0016】臓器提供者(ドナー)の末梢血リンパ球は、レシピエントが臓器移植を受ける前に移入する(donor specific transfusion)。免疫抑制剤としては、ステロイド剤、アザチオプリン、シクロスポリンA、ミゾリピン、デオキシスパーガリン、FK506、メソトレキセート、ラパマイシン、506BD等公知のものが、1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。

【0017】本発明の免疫抑制剤は、前記(a)、(b)及び(c)の3成分の組み合わせからなるものである。本発明の免疫抑制剤の投与方法の具体例は、次の通りである。

①移植7日前に、細胞間接着因子に対する抗体を投与する。

②この後、臓器の提供者(ドナー)の末梢血からリンパ球を採取し、臓器受容者(レシピエント)に静脈から注入する(DST)。

③免疫抑制剤を、この後3日間筋肉内投与する。

④前記の①～③の前処理を行った上で臓器移植を実施する。原則として、移植後は免疫抑制剤は使用しない。

【0018】また、免疫抑制剤、ドナーの末梢血からのリンパ球、及び細胞間接着因子に対する抗体を混合した後、移植前1週間から投与を開始することができる。本発明の免疫抑制剤を使用することにより、移植された臓器にのみ特異的に免疫反応を抑制することができ、他の

免疫反応を阻害しない。即ち、免疫寛容(トレランス; tolerance)が誘導される。

【0019】拒絶反応の主体は、T細胞の反応であると考えられている。T細胞は、生体内での免疫反応において中心的な役割を果たしており、中でも、ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞から抗原刺激を受け、IL-2などの様々なリンホカインを産生して他のエフェクターT細胞を活性化させる。抗原と反応したT細胞が産生し、放出するリンホカインにより移植組織が障害を受ける。また、キラーT細胞の誘導による移植細胞の破壊が生じる。

【0020】Schwartzらは、第2シグナルの欠如に基づく不応答(免疫寛容)の誘導メカニズムについて提唱を行っている(Annu. Rev. Immunol, vol. 7, p. 445-480, 1989)。

【0021】ヘルパーT細胞が抗原提示細胞(APC)により抗原提示を受けて、活性化されるためには、APC上の抗原Ia分子複合体の認識と共に、APCからの第2シグナル(costimulatory signal)を受け取ることが必要である。即ち、T細胞の活性化には、T細胞抗原レセプター(TCR)、抗原、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)に由来するシグナルに加えて、第2のシグナルが必要であり、第2のシグナルが欠如した状態で抗原刺激が起きると、T細胞の不活性化からトレランスが誘導される。このcostimulatory刺激をブロックすることにより、ヘルパーT細胞が活性化されないのみならず、免疫寛容に陥る。

【0022】T細胞-APC間の相互作用において、LFA-1のICAM-1への結合がそのcostimulatory signalを与えている可能が、van Seventerらにより示唆されている(J. Immunol vol. 144, p. 4579-4586, 1990)。このモデルに従えば、抗体によるLFA-1/ICAM-1のブロックによるトレランスの誘導は、T細胞の不活化によるクローン失活(clonal anergy)として説明することができる。

【0023】即ち、マウスを例にとれば、異種間の心臓移植において、トレランスが誘導できたマウスのリンパ球は、エフェクターT細胞である細胞障害性T細胞(CTL)の活性が抑制されているが、そのリンパ球をin vitroで混合リンパ球培養によりアロ抗原(異系の主要組織適合性抗原)による刺激を行うと、強いCTL活性を示す。したがって、このトレランスは、T細胞の抗原特異的細胞欠失(clonal deletion; クローンの消失)ではなくclonal anergyであると考えられる。しかし、抗体による阻害は、一部の例においてトレランスが誘導できているにすぎず、不十分な免疫抑制法である。

【0024】本発明の抗原特異的免疫抑制剤では、

(a) 細胞間接着因子に対する抗体による抑制に加え、
(b) ドナーの末梢血リンパ球のDSTによる特異的免疫抑制、及び(c) 免疫抑制剤による抑制を併用することにより、移植の拒絶反応の防止に対し、従来になく非常に優れた効果を示すことができる。これらの薬剤は、前記した投与方法により、移植前後の特定期間併用することが好ましい。

【0025】本発明の抗原特異的免疫抑制剤は、臓器移植、骨髓移植、皮膚移植等種々の移植による拒絶反応の抑制に有用であるとともに、自己免疫疾患における免疫応答の抑制や、アレルギー疾患におけるアレルギー反応の抑制にも応用することができる。

【0026】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、この実施例のみに限定されるものではない。

【0027】[実施例1] ラットの心移植を例に、本発明の免疫抑制剤の有効性を実証する。

①ドナー（提供者）レシピエント（受容者）

ドナーとして、F344ラットのオス8～10週齢を用い、レシピエントとして、WKAHラットのオス8～10週齢を用いた。

【0028】②抗原特異的免疫抑制剤

細胞間接着因子に対する抗体として、抗ラットICAM-1抗体及び抗ラットLFA-1抗体を、それぞれ10mg/kg用いた。ドナーの末梢血リンパ球として、F344ラットから脾臓を取り出し、細断後、細胞を浮遊させて、生理食塩水中に 1×10^6 個/mlの濃度に懸濁したものを使用した。免疫抑制剤としては、FK506を1mg/kg用いた。これらを混合した後、移植前7日から投与を開始した。

【0029】③移植

移植は、Ono and Lindsayらの変法に準じて、腹腔内に心臓を移植した。総虚血時間は、平均45分であった。

④拒絶反応の判定

移植片拒絶反応の判定は、腹壁上からの触診で、心拍動を確認することにより行い、拍動の停止をもって拒絶完成と判断した。また、トレランスは、100日間の生着をもって達成とした。

【0030】⑤生着日数

図2に生着日数の結果を示す。なお、図1に、細胞間接着因子に対する抗体で処理した後移植後の生着日数を示 *

*す。免疫抑制剤（図2のFK506処理の例）や抗体

（図1）のみでは、何も処理していないもの（図1の未処理の例）に比べて効果はあるが、トレランスを誘導するには至っていない。しかし、本発明の免疫抑制剤を用いた場合は、図2に示すように、Group1及び2のいずれにおいても、トレランスが誘導できた。

【0031】⑥移植片特異的免疫抑制

トレランスの誘導ができた個体について、抗原特異的なトレランスか否かを、リンパ球混合反応により検討した。即ち、F344ラットの脾細胞及び第3のグループACIラットの脾細胞を2000radのX線照射を行い不活化した。これらを刺激細胞とし、トレランスが誘導できた移植WKAHラットから脾細胞を調製し、その抗原応答性を調べた。その結果、図3及び図4に示すように、IL-2添加時にF344ラットに対する反応性は低下しているものの、ACIラットに対する反応性はコントロールと比べて差がなかった。このことから抗原特異的なトレランスを誘導できたと考えられる。

【0032】

【発明の効果】本発明によれば、臓器移植における臓器片拒絶反応を特異的に抑制し、かつ、移植後の臓器片拒絶反応を永続的に抑制することができる抗原特異的免疫抑制剤が提供される。本発明の抗原特異的免疫抑制剤は、臓器や組織の移植による拒絶反応の抑制、自己免疫疾患における免疫応答の抑制、アレルギー疾患におけるアレルギー反応の抑制等に使用することができる。

【図面の簡単な説明】

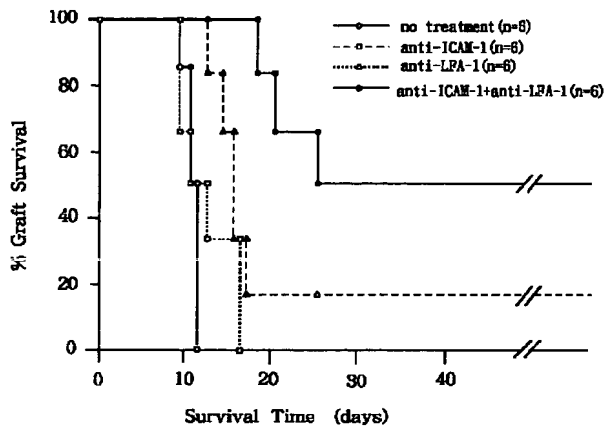
【図1】細胞間接着因子に対する抗体を投与した後、あるいは未処理で、移植後の心臓の生着日数を示すグラフである。

【図2】本発明の抗原特異的免疫抑制剤を投与した後（Groups 1-2）、あるいは免疫抑制剤FK506を投与した後、移植後の心臓の生着日数を示すグラフである。

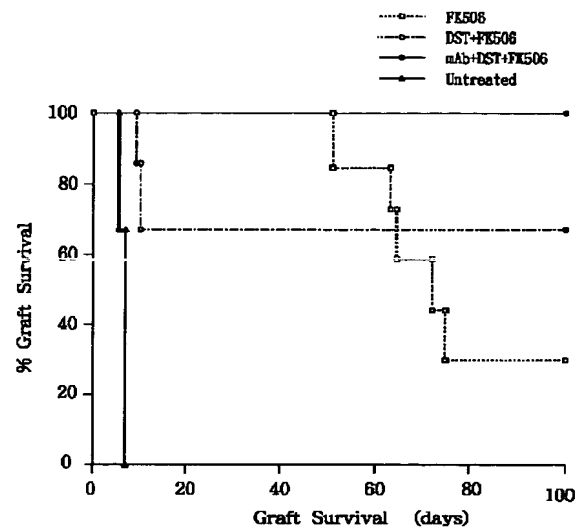
【図3】トレランス誘導後の抗原特異的抑制効果をリンパ球混合反応で調べた結果である。移植された提供者の臓器にのみ、免疫抑制がかかり、他の臓器免疫反応を全く抑制していないことを示している。

【図4】トレランス誘導後の抗原特異的抑制効果をリンパ球混合反応で調べた結果である。移植された提供者の臓器にのみ、免疫抑制がかかり、他の臓器免疫反応を全く抑制していないことを示している。

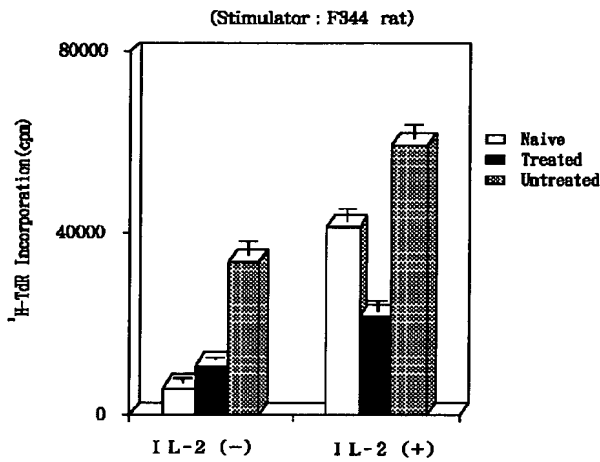
【図1】



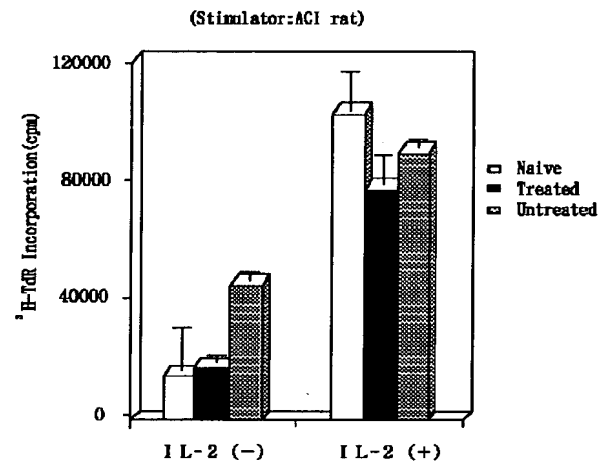
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

A 6 1 K 39:395
35:26)

識別記号

庁内整理番号

9284-4C
7431-4C

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 中田 元巳

大阪府大阪市此花区島屋一丁目1番3号
住友電気工業株式会社大阪製作所内